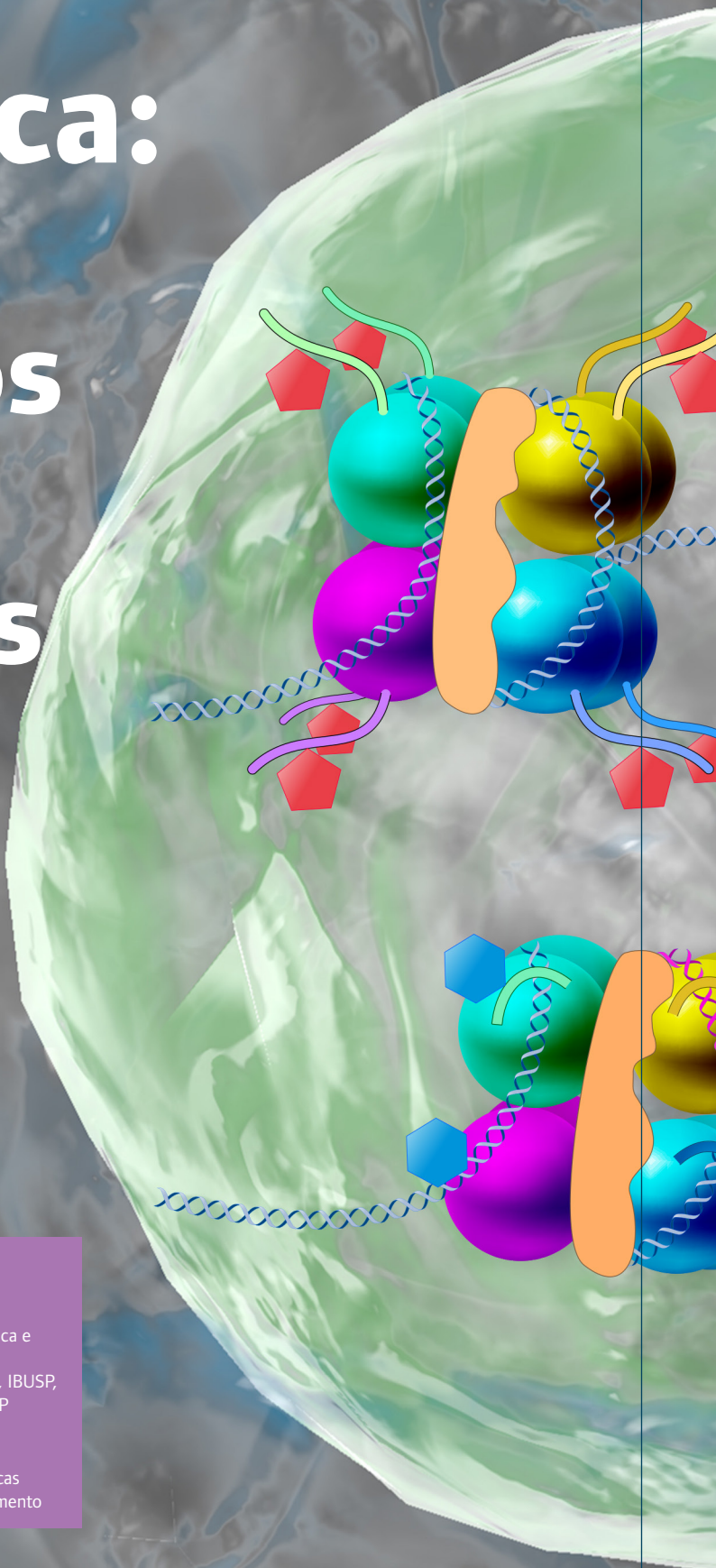


Epigenética: conceito, mecanismos e impacto em doenças humanas



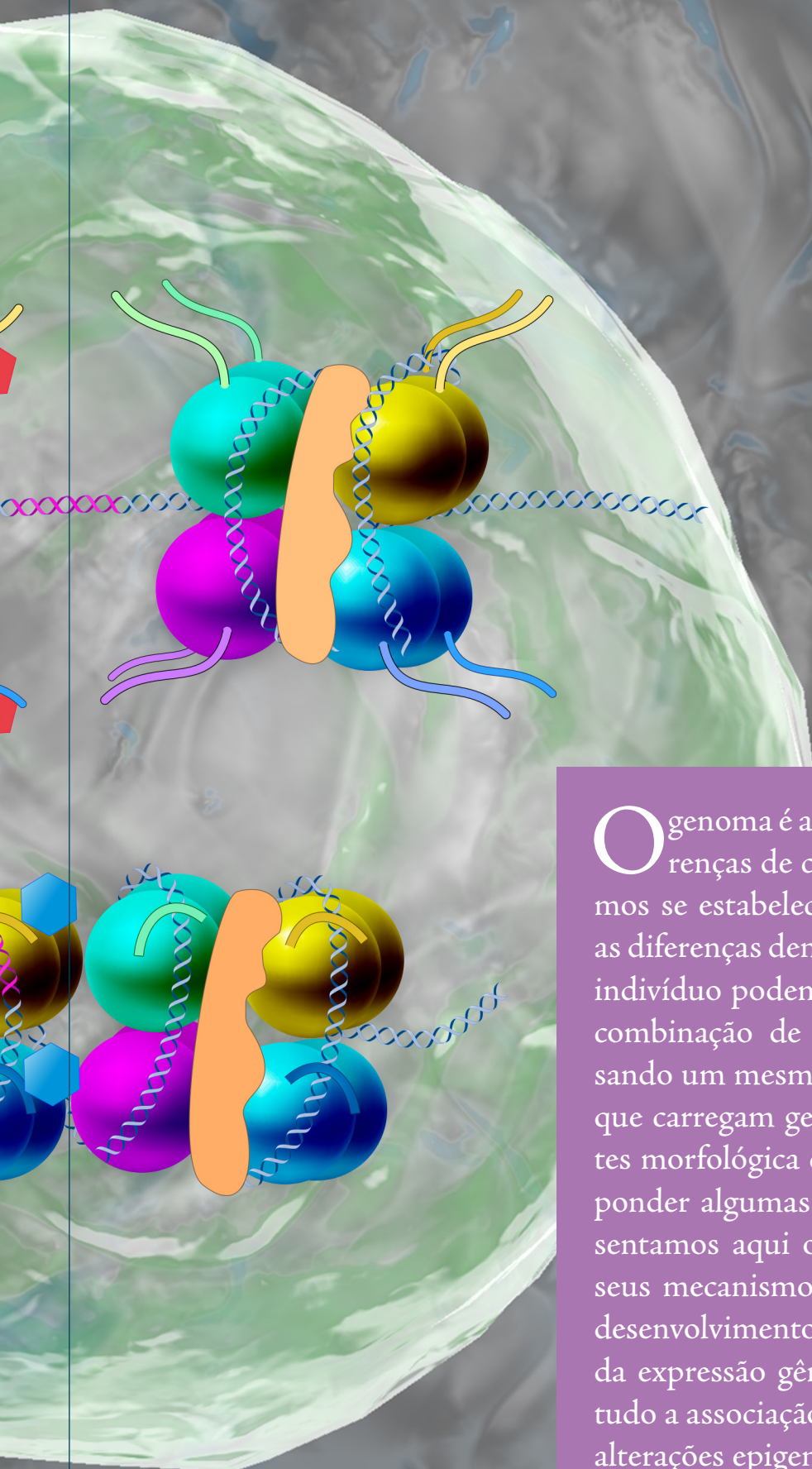
**Maria Prates Rivas^{1,2}, Anne Caroline Barbosa Teixeira¹,
Ana Cristina Victorino Krepischi¹**

¹ Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, São Paulo, SP

² Programa de pós-graduação, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IBUSP, Universidade de São Paulo. Rua do Matão, 14, CEP 05508-090, São Paulo, SP

Autor para correspondência - ana.krepischi@ib.usp.br

Palavras-chave: epigenética, metilação de DNA, RNAs não codificadores, marcas epigenéticas, alterações pós-transcricionais em caudas de histonas, desenvolvimento



O genoma é a base a partir da qual as diferenças de características entre organismos se estabelecem. Entretanto, nem todas as diferenças dentro de uma mesma espécie e indivíduo podem ser explicadas apenas pela combinação de variantes genéticas. Analisando um mesmo indivíduo, por que células que carregam genoma idêntico, são diferentes morfológica e funcionalmente? Para responder algumas questões como essas, apresentamos aqui o conceito de Epigenética e seus mecanismos, explorando seu papel no desenvolvimento embrionário e na regulação da expressão gênica. Está em foco neste estudo a associação entre exposição ambiental, alterações epigenéticas e doenças humanas.

A vida é caracterizada por imensa diversidade. Existem diferenças evidentes das características de diferentes espécies, mas também entre indivíduos de uma mesma espécie, como, por exemplo, as variações na altura, cor dos olhos e peso em seres humanos. Na atual era pós-genômica, as diferentes manifestações de uma mesma característica (**fenótipo**) são frequentemente atribuídas a variações na sequência de nucleotídeos da molécula de DNA (**genótipo**), com contribuição de fatores ambientais em diferentes níveis. De fato, o genoma humano em suas diferentes versões, que resultam de eventos de mutação e de recombinação, é a base a partir da qual as diferenças fenotípicas entre seres humanos se estabelecem. Entretanto, nem todas as diferenças podem ser explicadas apenas pela combinação de **variantes genéticas**. Por exemplo, se todas as células de um mesmo indivíduo carregam genoma idêntico, como podem existir os diferentes tipos celulares que constituem o corpo humano, com fenótipos tão distintos quanto o de uma célula de retina e uma de fígado?

O processo de aquisição de um fenótipo específico por cada tipo celular chama-se diferenciação celular. Esse fenótipo ou identidade celular deve ser mantido durante a vida útil da célula e também ser transmitido às suas células-filhas durante as divisões celulares subsequentes. O estabelecimento e manutenção dessa diversidade de fenótipos são alcançados de maneira independente da sequência de DNA, por meio de marcas no genoma que modificam sua expressão. Essa identidade celular estável, transmitida através das divisões celulares, sem alteração na sequência de DNA, bem como suas modificações em resposta ao ambiente e a estados patológicos, é o objeto de estudo da **epigenética**.

Conrad Waddington introduziu o termo epigenética em 1942, tendo definido como “*ramo da biologia que estuda as interações casuais entre genes e seus produtos que trazem o fenótipo ao ser*” (WADDINGTON, 1942). No sentido original desta definição, epigenética se refere ao estudo de todas as vias moleculares que modulam a expressão dos genes para resultarem num determinado fenótipo. Atualmente, a epigenética é definida como

“o estudo das alterações na função do gene que podem ser herdadas por mitose ou meiose e que não envolvem mudança na sequência de nucleotídeos do DNA” (WU; MORRIS, 2001). É importante salientar que faz parte do conceito de epigenética a reversibilidade; ou seja, os fenótipos diferentes produzidos a partir da mesma sequência de DNA por meio de modificações epigenéticas são potencialmente reversíveis, uma vez que não há mudança na sequência dos nucleotídeos do DNA. Portanto, as **marcas epigenéticas** não são fixas e podem ser modificadas.

Essas marcas epigenéticas são modificações bioquímicas nos nucleotídeos da molécula de DNA ou em outros elementos que compõem a **cromatina**. As marcas epigenéticas principais compreendem modificações de aminoácidos localizados nas proteínas histonas (que fazem parte da cromatina) e modificações covalentes nos nucleotídeos. De maneira geral, essas marcas regulam o acesso da maquinaria de transcrição de RNA à sequência dos genes, promovendo ou impedindo o processo. O conjunto de marcas epigenéticas de uma célula é chamado de epigenoma. Esse epigenoma estabelece diferentes formas de acesso à informação contida no DNA, possibilitando que, após a fertilização, o zigoto com um único genoma dê origem aos mais de 200 tipos celulares do corpo de um ser humano. Outro nível de modulação das marcas epigenéticas decorre da interação do genoma de um organismo com o meio ambiente interno e externo ao longo da vida, levando ao estabelecimento de epigenomas diversos e em constante adaptação. Um exemplo desse nível de atuação da epigenética pode ser observado em gêmeos monozigóticos, que carregam genomas idênticos e, no entanto, exibem algumas diferenças fenotípicas, que se acentuam com o passar dos anos; gêmeos monozigóticos têm genomas idênticos, mas seus epigenomas são diferentes.

1. MECANISMOS EPIGENÉTICOS MAIS ESTUDADOS

1.1. Metilação de DNA

A metilação de DNA é uma das modificações epigenéticas mais estudadas em orga-

Fenótipo é a característica observável de um organismo; resulta da interação entre a expressão do genótipo e fatores ambientais.

Genótipo é a composição genética de um indivíduo; em geral, referindo a um gene específico.

Marcas epigenéticas são modificações bioquímicas na molécula de DNA ou em outros elementos que compõem a cromatina.

Cromatina é uma estrutura formada principalmente por uma molécula de DNA e proteínas associadas.

Variantes genéticas são diferenças na sequência de nucleotídeos entre indivíduos.

Epigenética é o estudo das alterações na expressão do gene que podem ser herdadas por mitose ou meiose e que não envolvem mudança na sequência de nucleotídeos do DNA, sendo potencialmente reversíveis.

Metilação de DNA é a reação química que consiste na adição de um grupo metila (-CH₃) a um nucleotídeo da molécula de DNA.

Heterocromatina -

segmentos de cromatina altamente condensada.

Dinucleotídeos CpG -

sequência de DNA na qual um nucleotídeo de citosina é seguido por um nucleotídeo guanina, linearmente na direção 5' → 3'. CpG é a abreviatura de 5'-C-fosfato-G-3', isto é, citosina e guanina adjacentes na mesma fita, unidas por um grupo fosfato.

Eucromatina - segmentos de cromatina menos compactados.

Ilhas CpGs - regiões do genoma nas quais há uma maior densidade relativa de dinucleotídeos CpGs.

Acetilação - reação que introduz um grupo funcional acetila em resíduos de lisina na ramificação N-terminal das histonas.

Fosforilação - adição de um fósforo que pode ocorrer em todas as classes das histonas, em resíduos de serina e treonina.

nismos uni e multicelulares. Nos eucariotos, a metilação do DNA ocorre principalmente nas bases do tipo citosina, as quais são convertidas em 5-metilcitosina (5mC) pelas enzimas DNA-metiltransferases (DNMT). As citosinas metiladas (5-metil-citosinas) usualmente (mas não exclusivamente) estão adjacentes a um nucleotídeo de guanina (**dinucleotídeos CpG**), resultando em duas citosinas metiladas localizadas diagonalmente uma à outra (figura 1A), uma em cada fita da molécula de DNA. Os membros da família de enzimas DNMT agem de duas maneiras principais: adicionando grupos metil na sequência de DNA onde antes não havia metilação (metilação *de novo*), ou copiando a metilação da fita de DNA molde para uma nova fita complementar durante a replicação (metilação de manutenção), o que possibilita a transmissão do padrão de metilação durante as divisões celulares. A metilação de DNA é uma marca epigenética que pode ser retirada por enzimas específicas e também pode ser perdida pela inibição da enzima DNMT de manutenção.

Em mamíferos, a metilação pode estar concentrada em regiões do genoma nas quais há uma maior densidade relativa de dinucleotídeos CpGs (**ilhas CpGs**), ou em CpGs isolados distribuídos pelo genoma. A localização da metilação na sequência de um gene influencia o controle de sua expressão. Por exemplo, a metilação em região promotora da transcrição bloqueia a transcrição e, portanto, reprime a expressão do gene; já a metilação no corpo do gene não tem esse efeito e, em alguns casos, pode até estimular a transcrição e ter efeito na recomposição do RNA mensageiro daquele gene.

1.2. Modificações de proteínas histonas

O conteúdo de DNA do genoma humano encontra-se distribuído por 24 diferentes cromossomos, os 22 autossomos acrescidos dos cromossomos X e Y. Cada cromossomo contém uma única e longa molécula de DNA que está associada a grupos de proteínas histonas, em estruturas chamadas nucleossomos. Cada nucleossomo é constituído por um octâmero de proteínas formado por duas cópias de cada um dos tipos de proteínas

histonas (H2A, H2B, H3 e H4) associado a uma sequência de DNA de cerca de 147 pares de bases, que está enrolada sobre esse octâmero (figura 1B). A molécula de DNA organizada em nucleossomos forma a cromatina, que não é uniforme em estrutura, apresentando segmentos altamente condensados (**heterocromatina**) e outros menos compactados, na **eucromatina**. Esse grau de compactação da cromatina é dinâmico e sua conformação pode ser alterada em resposta a sinais endógenos e exógenos.

As histonas têm uma cauda terminal de aminoácidos que fica exposta nos nucleossomos (figura 1B). As caudas têm aproximadamente 20-35 aminoácidos e são sujeitas a modificações bioquímicas que afetam a atividade transcricional dos genes associados. As diferentes modificações das histonas podem afrouxar ou estreitar a associação entre histonas e DNA, facilitando ou restringindo o acesso ao DNA dos fatores de transcrição e da maquinaria transcricional. Metilação, **acetilação** e **fosforilação** de histonas são algumas das modificações descritas como marcas ativadoras ou silenciadoras da expressão gênica. Por exemplo, trimetilação da lisina 27 na histona H3 é encontrada nos nucleossomos que compõem a cromatina de genes inativos, enquanto a mesma modificação em outra lisina (na posição 36) marca a cromatina associada a genes ativos.

Cada marca isoladamente não confere ao gene um estado de transcrição ativo ou inativo; as modificações nas histonas compõem um painel de marcas que é “lido” em conjunto por enzimas específicas (*readers*). A introdução dessas modificações é efetuada por enzimas chamadas de “escritoras” (*writers*), que incluem metiltransferases (HMTs) e acetiltransferases (HATs), responsáveis pela metilação e acetilação de caudas de histonas, respectivamente. Da mesma forma que a metilação de DNA, tais marcas epigenéticas de histonas são estáveis, mas podem ser reversíveis, e sua remoção é efetuada por enzimas também específicas (*erasers*), como histona desmetiltransferases (HDMTs) e desacetilases (HDACs).

Existem formas variantes de histonas que diferem em um ou poucos aminoácidos em

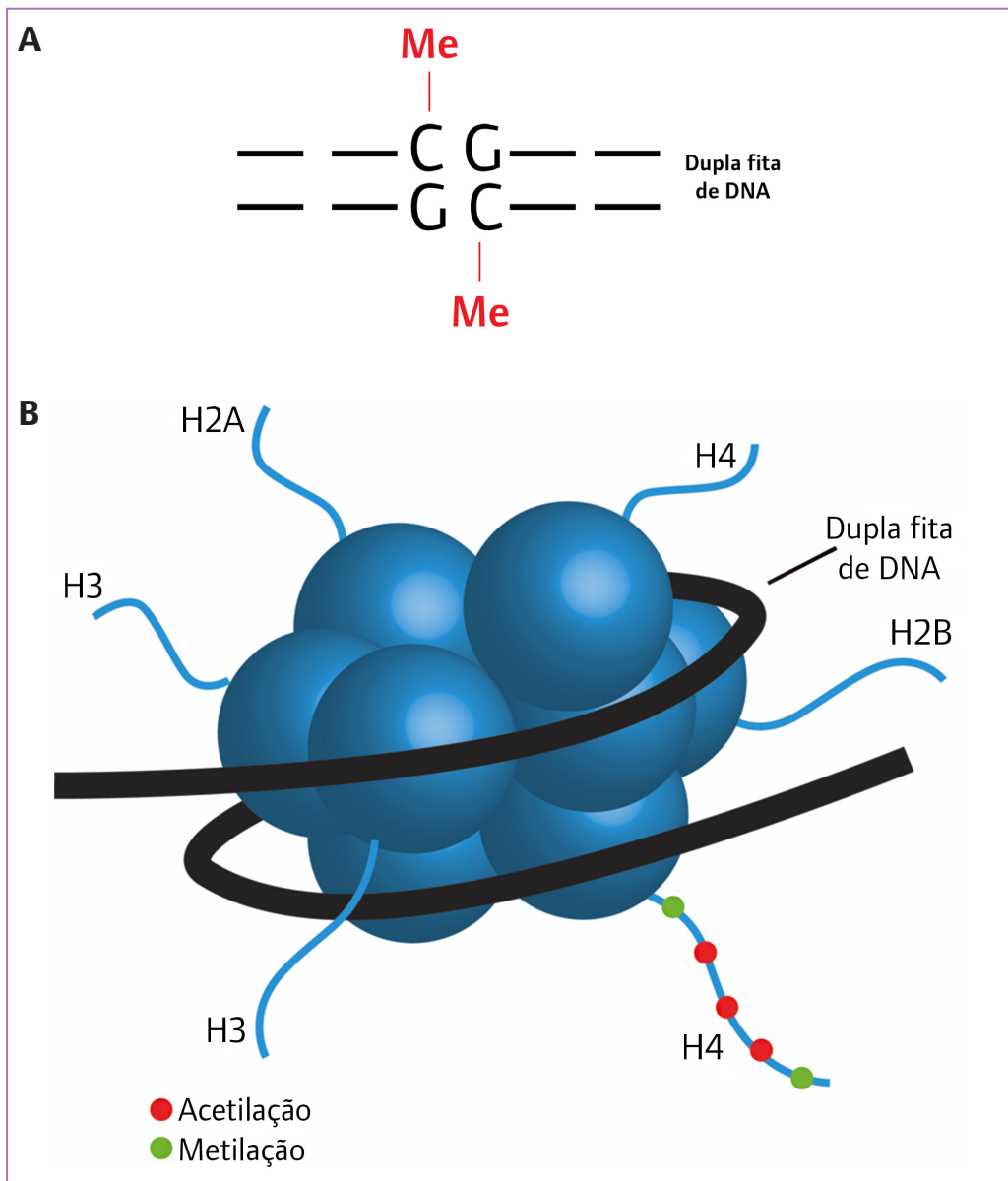


Figura 1. Mecanismos de modificação epigenética: metilação de DNA e modificações da cauda de proteínas histonas. (A) Metilação de nucleotídeos citosina na molécula de DNA. As citosinas (C) metiladas (Me) usualmente estão adjacentes a um nucleotídeo de guanina (dinucleotídeo CpG), resultando em duas citosinas metiladas localizadas diagonalmente uma à outra, uma em cada fita da molécula de DNA. (B) A molécula de DNA de cada cromossomo está associada a grupos de proteínas histonas, formando estruturas chamadas nucleossomos. O nucleossomo é formado por uma sequência de DNA de 147 pares de bases (fita preta) que envolve um octâmero de proteínas formado por duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. A histona tem uma cauda terminal (indicada pelas fitas em azul) de 20-35 aminoácidos que fica exposta no nucleossomo e é sujeita a modificações bioquímicas, como metilação (verde) e acetilação (vermelho), entre outras. As diferentes modificações das histonas podem afrouxar ou estreitar a associação entre as histonas e o DNA, facilitando ou restringindo o acesso ao DNA dos fatores de transcrição e da maquinaria transcripcional; dessa maneira, as modificações de histonas afetam diretamente a atividade transcripcional dos genes associados.

relação às histonas-padrão e que estão em frequência muito menor na cromatina. Em algumas regiões especiais da cromatina, as histonas regulares são substituídas por essas variantes mais raras. Essas variantes de histonas fornecem um nível mais fundamental de diferenciação da cromatina, fornecendo a base para processos epigenéticos, incluindo segregação de cromossomos. A substituição da histona-padrão por uma variante é especialmente importante nos centrômeros, nos quais a histona H3 é substituída por sua variante CENP-A. Adicionalmente, as variantes de histonas também estão envolvidas nas propriedades epigenéticas de genes ativos; as histonas H3.3 e H2A.Z (variantes de H3 e H2A, respectivamente) estão enriquecidas

em genes com alta atividade transcripcional. Além desses processos universais, variantes de histonas também estão relacionadas a fenômenos epigenéticos particulares, como a inativação de um dos cromossomos X em fêmeas de mamíferos.

2. EPIGENÉTICA E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Como os diferentes tipos celulares de um mesmo indivíduo, com um genoma idêntico, conseguem ser tão distintos? E como essa **memória celular** é mantida ao longo das divisões celulares? Para responder essas questões é preciso considerar a combinação entre genoma e epigenoma.

Memória celular é o conjunto de informações epigenéticas de uma célula que pode ser transmitido por sucessivas divisões mitóticas.

Nosso genoma carrega cerca de 20.000 genes codificadores de proteína. Um tipo celular é definido pelo subconjunto de genes que estão ativos. Esse grupo de genes ativos e seus transcritos (RNA mensageiros) codificam os componentes físicos e as proteínas necessárias para que cada célula execute sua função especializada. Os diferentes tipos celulares são estabelecidos durante o desenvolvimento embrionário e mantidos através dos ciclos de divisão celular, perpetuando padrões especializados de expressão gênica.

Dentre os diversos tipos celulares do corpo humano há as células-tronco, caracterizadas pela capacidade de auto-renovação, ou seja, podem se multiplicar gerando células iguais a si e, pelo potencial de diferenciação, são capazes de originar diversos tipos celulares. Em geral, as células-tronco são classificadas em embrionárias ou adultas. As primeiras são capazes de gerar qualquer tipo de célula do organismo e possuem alta capacidade de diferenciação (pluripotência). Já as células-tronco adultas são encontradas em maior quantidade na medula óssea e sangue do cordão umbilical, assim como em locais específicos dos órgãos, e apresentam capacidade limitada de diferenciação, dando origem somente aos subtipos celulares de tecidos dos quais derivam.

Mórula é o primeiro estágio da embriogênese, logo após a fertilização, no qual o zigoto sofre sucessivas clivagens até a formação do blastocisto. Este estágio caracteriza-se por uma massa sólida com cerca de 12 a 32 células.

Em geral, no início do desenvolvimento, há a diminuição do nível global de metilação do DNA nestas células, permitindo a expressão de genes associados à pluripotência, como *NANOG* e *POU5F1* (ou *OCT4*). Posteriormente, os genes que são responsáveis por manter a pluripotência são reprimidos como resultado de um aumento da metilação do DNA, assim como há o aumento da expressão dos genes específicos de desenvolvimento em resposta à promoção da metilação da H3K4 nos nucleossomos. Em consequência, as células-tronco iniciam o processo de diferenciação celular, que culminará no acúmulo progressivo de marcas epigenéticas que produzirão um padrão específico de expressão gênica para cada tipo celular.

Blastocisto é o segundo estágio da embriogênese; esfera oca de células embrionárias, conhecidas como blastômeros, em torno de uma cavidade interna com fluido chamada blastocelo.

Ao final desse processo de estabelecimento da identidade funcional de cada tipo celular, a célula é referida como diferenciada. O padrão de expressão gênica de uma célula diferenciada é mantido estável através das divi-

sões celulares, indicando que a diferenciação celular é um processo unidirecional, em geral não reversível. É importante mencionar que os tecidos mantêm uma espécie de reservatório de células-tronco, ou seja, células não diferenciadas que retêm a capacidade de se diferenciar nos diferentes tipos celulares daquele tecido, para reposição celular.

3. REGULAÇÃO E REPROGRAMAÇÃO EPIGENÉTICA NO DESENVOLVIMENTO

As marcas epigenéticas compõem a memória celular de modo a manter o padrão de expressão gênica em células especializadas, preservando a identidade da linhagem celular após consecutivas divisões mitóticas. Contudo, em dois momentos ao longo do desenvolvimento o epigenoma é alterado de forma radical: após a formação do zigoto e na formação dos gametas.

Após a fusão dos gametas materno e paterno, os genomas de ambos permanecem fisicamente separados no zigoto (pró-núcleo masculino e feminino), submetidos a distintas alterações no DNA e cromatina. Como exemplo, o genoma de origem paterna sofre desmetilação de DNA ativa nas primeiras 24 horas pós fertilização, enquanto que o genoma materno é desmetilado lentamente por mecanismo passivo, após sucessivas replicações. Este processo de desmetilação do genoma ocorre entre os estágios de zigoto e **mórula**, permitindo que as células mantenham características de totipotência. Já na fase de **blastocisto** há o primeiro sinal de diferenciação celular: a camada interna das células constitui o embrioblasto ou massa celular interna, o qual dará origem ao embrião propriamente dito, e a camada externa constitui o trofoblasto, que origina membranas fetais e o saco vitelínico. A diferenciação entre esses dois tecidos na fase de blastocisto, compreende distintos eventos epigenéticos, que incluem diferenças no padrão de acetilação e metilação e disponibilidade de fatores de transcrição. Com o decorrer do desenvolvimento, marcas epigenéticas são subsequentemente estabelecidas à medida que ocorrem os processos de diferenciação e formação das linhagens que compõem o indivíduo.

Nas primeiras fases embrionárias são também formadas as células germinativas primordiais, que darão origem aos gametas. A provável finalidade da reprogramação do epigenoma de gametas é a remoção de modificações epigenéticas adquiridas durante a vida

do indivíduo, em decorrência da interação com fatores ambientais. Durante o processo de maturação, os gametas adquirirão marcas epigenéticas diferenciais, características do sexo feminino ou do sexo masculino, chamadas de *imprinting* (figura 2).

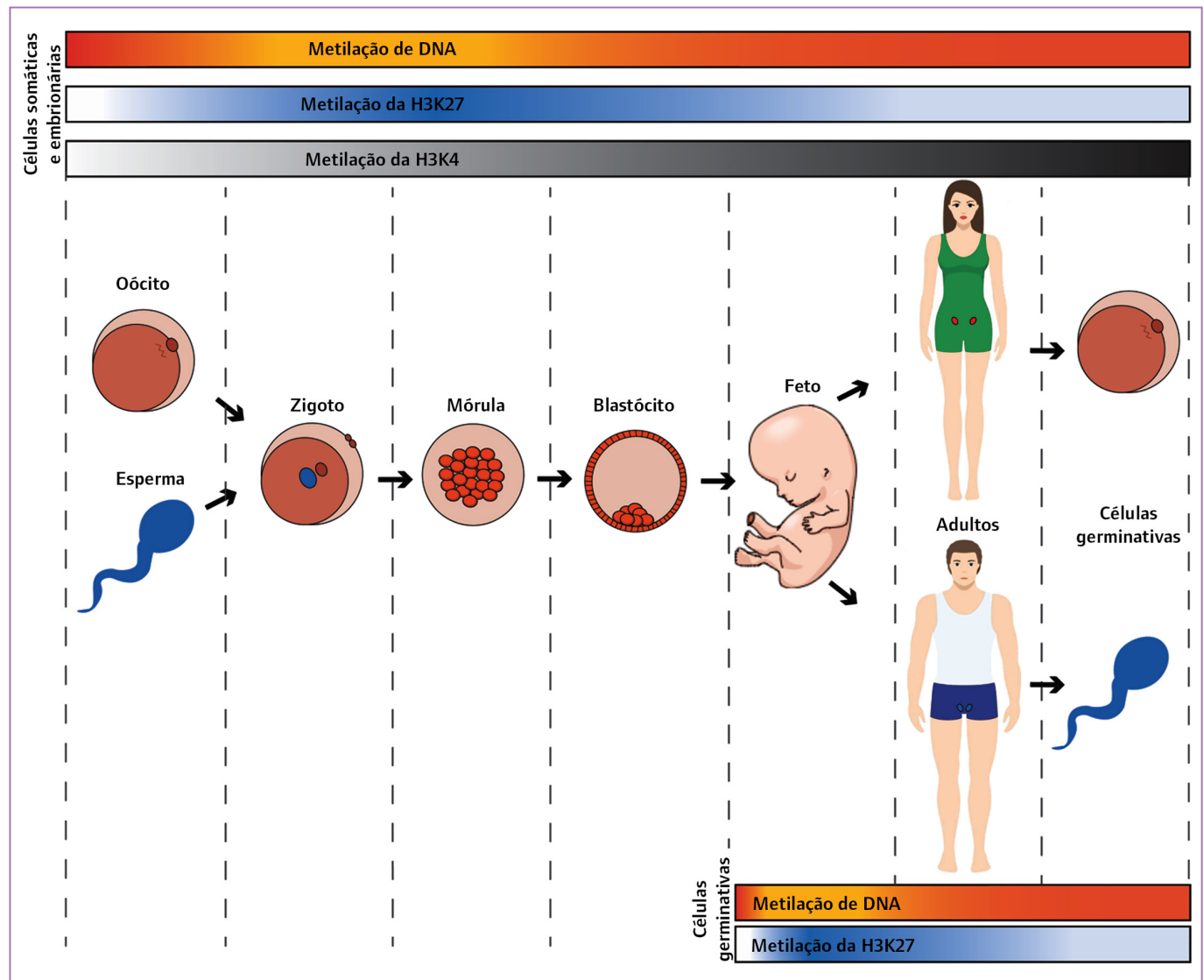


Figura 2.

Regulação epigenética durante o desenvolvimento de mamíferos. O nível das marcas epigenéticas está indicado pela graduação de cores das barras, sendo o tom mais escuro correspondente à maior quantidade da marca; em vermelho, metilação de DNA, em azul, metilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27) e em cinza, metilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4). No início da embriogênese (zigoto/mórula), ocorre grande perda de metilação de DNA e os genes de diferenciação e desenvolvimento são reprimidos pela metilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27 – marca de silenciamento gênico). Quando se inicia a diferenciação das células, os genes associados à pluripotência são reprimidos por metilação de DNA. Ao mesmo tempo, os genes do desenvolvimento começam a ser expressos e há um aumento na metilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4 – marca de atividade gênica). O desenvolvimento das células germinativas se inicia com ganho de metilação de DNA; apenas os genes sujeitos a *imprinting* sofrem desmetilação, com consequente apagamento das marcas dos genitores. Marcas como a metilação do H3K27 permitem que os genes de diferenciação e desenvolvimento sejam silenciados por um curto período de tempo nas células germinativas primordiais. Posteriormente, a metilação de DNA nas células germinativas permite o silenciamento estável de genes de *imprinting*, **transposons** e alguns genes associados à pluripotência.

Transposons - sequências de DNA que tem capacidade de autoreplicação e inserção em outros sítios do genoma, em geral com atividade reprimida por metilação de DNA.

4. MECANISMOS EPIGENÉTICOS CLÁSSICOS DE REGULAÇÃO GÊNICA EM MAMÍFEROS: INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X E IMPRINTING

Inativação do cromossomo X é o

mecanismo epigenético de compensação de dosagem gênica entre os sexos feminino e masculino de mamíferos.

Figura 3.

Corpúsculo de Barr. A inativação do cromossomo X é um fenômeno que ocorre no início do desenvolvimento embrionário em todas as células somáticas de fêmeas de mamíferos (XX). Nas fêmeas, apenas um cromossomo X permanece ativo em cada célula e, portanto, um dos cromossomos X é inativado por meio da metilação do DNA, de maneira aleatória (X paterno ou materno). O cromossomo X inativo (Xi) pode ser visualizado ao microscópio como uma massa heterocromática (apontada pelas setas nas células XX, painel à direita), chamada de corpúsculo de Barr, localizada na periferia do núcleo celular. As células somáticas de machos de mamíferos (XY) carregam apenas um cromossomo X ativo em todas as células e não possuem corpúsculo de Barr (Figura adaptada de http://www.mun.ca/biology/scarr/Barr_Bodies.html. Créditos: © Steven M Carr, Terra Nova Genomics, Inc.).

Imprinting genômico é o padrão de expressão diferencial de um grupo particular de genes de acordo com a origem parental do alelo.

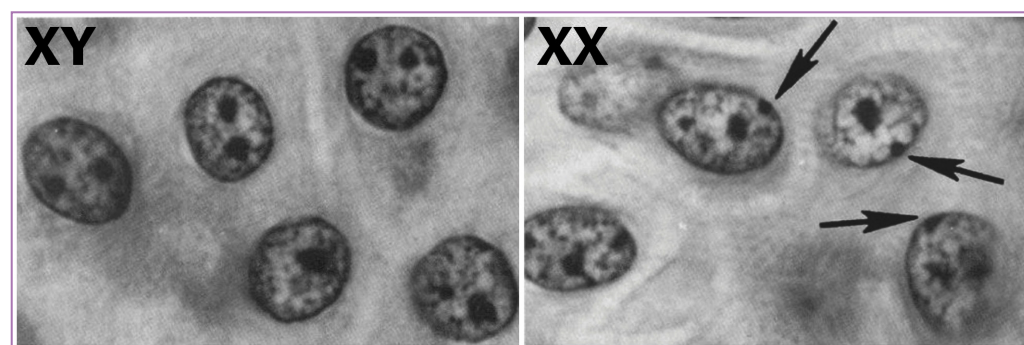
4.1. Inativação do cromossomo X

Durante a evolução dos organismos, a aquisição de um gene determinante do sexo em apenas um dos cromossomos de um par de homólogos resultou no surgimento de cromossomos sexuais. Com o passar do tempo, os cromossomos sexuais ficaram amplamente diferentes um do outro. Esta dissimilaridade entre os cromossomos sexuais origina uma desigualdade da dosagem gênica entre os dois sexos. Diminuindo esse desequilíbrio entre a quantidade dos produtos gênicos entre os dois sexos, muitas espécies têm mecanismos de compensação de dosagem de genes, com base epigenética. Esses mecanismos epigenéticos de compensação da dosagem dos genes localizados nos cromossomos sexuais variam dentre as espécies, desde a simples regulação do nível da atividade transcri-

cional até o silenciamento completo de um dos cromossomos sexuais, como é o caso dos humanos e todos os outros mamíferos placentários.

A inativação do cromossomo X é um fenômeno que ocorre no início do desenvolvimento embrionário em todas as células somáticas de fêmeas de mamíferos, no qual um dos cromossomos X é inativado de maneira aleatória em cada célula; ou seja, as fêmeas são um mosaico formado por células com um cromossomo X inativo, de origem materna ou de origem paterna. A metilação de DNA é um fator crucial para a manutenção do estado inativo dos cromossomos X que foram silenciados aleatoriamente. Adicionalmente, a inativação do cromossomo X é também mantida por modificações nas histonas que estão associadas ao silenciamento transcripcional.

A escolha de qual dos dois cromossomos será inativado em cada célula ainda é objeto de intenso estudo. O cromossomo X inativo (Xi) pode ser visualizado ao microscópio como uma massa heterocromática (muito corada) chamada de corpúsculo de Barr, localizado na periferia do núcleo de células de fêmeas de mamíferos (figura 3).



4.2. Imprinting genômico

O *imprinting* genômico é um fenômeno que afeta aproximadamente 100 genes do genoma humano e resulta na expressão diferencial destes genes de acordo com a origem parental: apenas um dos alelos dos genes que sofrem *imprinting* é expresso, alguns são ativos apenas nos cromossomos de origem materna e outros ativos apenas em cromos-

somos de origem paterna. Esse padrão de expressão diferencial deste grupo particular de genes, de acordo com a origem parental, decorre da existência de marcas epigenéticas que são estabelecidas nas células germinativas parentais. A diferença mais consistente entre os alelos de um gene que sofre *imprinting* é na metilação do DNA, mas também ocorrem diferenças na conformação da cro-

matina, modificação das histonas, tempo de replicação e taxa de recombinação na meiose. Sabe-se que os genes que sofrem *imprinting* têm atuação importante no desenvolvimento pré-natal e também na biologia placentária, assim como também exercem efeitos importantes no desenvolvimento, crescimento e sobrevivência pós-natal. Esse grupo de genes de *imprinting* está emergindo como regulador-chave de processos metabólicos em bebês e adultos; podem influenciar a manutenção da temperatura corporal, ingestão de alimentos e adiposidade, agindo em vários tecidos e vias.

5. DOENÇAS HUMANAS E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS

Distúrbios no epigenoma podem resultar na ativação ou inibição de genes de maneira inapropriada; deste modo, a fisiologia celular normal é alterada, o que pode ocasionar o desenvolvimento de patologias, congênicas ou adquiridas.

Defeitos de *imprinting* genômico são causa de condições congênicas que afetam o crescimento e desenvolvimento, como as síndromes de **Beckwith-Wiedemann**, **Prader-Willi** e **Angelman**, por exemplo. Em casos como a síndrome de Beckwith-Wiedemann, a **hipometilação** do gene *IGF2* por causa de um defeito de *imprinting* resulta no aumento da expressão deste gene durante o período pré-natal, ocasionando o hiper crescimento característico dos pacientes. Por outro lado, na síndrome de **Silver-Russell**, caracterizada por crescimento diminuído, há alterações no perfil de metilação, também decorrentes de defeitos de *imprinting*, que resultam na diminuição da expressão do gene *IGF2* no período pré-natal. Modificações epigenéticas congênicas também podem ocorrer por alterações em genes relacionados à maquinaria epigenética, como exemplo a hipometilação global observada na **Síndrome ICF** (imunodeficiência, instabilidade da região centromérica e anomalias faciais), que é causada por mutação em um gene que codifica uma das enzimas que adicionam metilação ao DNA (*DNMT3B*).

Além das síndromes conhecidas de defeitos de *imprinting*, há evidências crescentes de que existe expressão alterada dos genes de *imprinting* em uma ampla gama de doenças comuns, como restrição do crescimento intrauterino, obesidade, diabetes mellitus, transtornos psiquiátricos e câncer. Quanto a essas doenças não-congênicas, em geral de manifestação tardia, é importante sempre lembrar que qualquer característica (fenótipo) é resultado da interação entre variantes genéticas (genótipo) e o ambiente. Atualmente, há um considerável interesse em saber como os fatores ambientais atuam no genoma para influenciar o fenótipo por meio da modulação de marcas epigenéticas. Nos últimos anos, várias pesquisas examinaram a relação entre exposição a fatores ambientais e mudanças do epigenoma, incluindo poluentes químicos, nutrição, alterações de temperatura, estresse, nível de atividade física, ciclo circadiano, tabagismo e consumo de álcool, entre outros.

Evidências crescentes mostram que as marcas epigenéticas conhecidas, como metilação de DNA e modificações de histonas, são influenciadas por fatores exógenos. A relação entre a fumaça do tabaco e a alteração da metilação do DNA parece particularmente relevante, dado que vários genes supressores de tumor mostram um aumento de metilação em células normais de pulmão de fumantes e ex-fumantes, o que poderia levar a uma diminuição de sua expressão. Os mecanismos subjacentes permanecem amplamente desconhecidos, mas se espera que a epigenética ajude a trazer uma compreensão mais completa das respostas individuais ao ambiente e a fatores de risco, em combinação com as diferenças genéticas.

Um perfil epigenético específico foi observado em pacientes com doenças neurodegenerativas, como a hipometilação e alteração na expressão gênica em Alzheimer e Parkinson; outros estudos também evidenciam modificações no perfil epigenético em pessoas com esquizofrenia e com **doença de Huntington**, dentre outras doenças. Alterações epigenéticas também são descritas em diabetes, doenças autoimunes como lúpus

Síndrome de Beckwith-

Wiedemann - doença caracterizada por aumento de crescimento, predisposição tumoral e malformações congênicas.

Síndrome de Prader-Willi

- hipotonia grave e dificuldades alimentares no início da infância, seguidos de ingestão excessiva de alimentos, obesidade mórbida e atraso cognitivo, em geral moderado.

Síndrome de Angelman

- deficiência intelectual grave, convulsões, microcefalia pós-natal e características dismórficas faciais distintas.

Hipometilação - nível de metilação diminuído em relação ao tecido controle.

Síndrome de Silver-

Russell - baixa estatura proporcional, dismorfismos faciais, assimetria de membros, risco significativo de atraso no desenvolvimento (tanto motor quanto cognitivo) e dificuldades de aprendizagem.

Síndrome ICF

(imunodeficiência, instabilidade da região centromérica e anomalias faciais): doença autossômica recessiva rara caracterizada por imunodeficiência e anomalias faciais.

Doença de Huntington

- doença neurodegenerativa progressiva rara do sistema nervoso central caracterizada por movimentos coreicos, alterações comportamentais e psiquiátricas e demência.

e artrite reumatoide, doenças pulmonares como asma, assim como no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e obesidade. Em todas essas doenças de desenvolvimento lento e gradual, com manifestação tardia, muito provavelmente os fatores de risco já conhecidos, como alimentação, sedentarismo, tabagismo, poluição e estresse, atuam em conjunto para produzir alterações das marcas epigenéticas que contribuirão para o desenvolvimento do fenótipo.

Instabilidade genômica

- alta frequência de mutações no genoma, que podem incluir alterações nas sequências de ácidos nucleicos, rearranjos cromossômicos e aneuploidias.

5.1. Epigenética do câncer

O câncer se desenvolve a partir do acúmulo de mutações genéticas em células somáticas, ao longo de um período extenso de tempo, em geral décadas. Atualmente, a interação entre processos genéticos e alterações epigenéticas é considerada a chave para o desenvolvimento tumoral, resultando em expressão anormal de genes importantes para proliferação celular (proto-oncogenes) e controle do ciclo celular (supressores tumorais). Além de mutações em proto-oncogenes e supressores tumorais, a tumorigênese é modulada por modificações na compactação

e acessibilidade da cromatina, que são definidas por mecanismos epigenéticos como modificações de histonas, metilação de DNA e reposicionamento de nucleossomos.

Aberrações epigenéticas foram descritas em praticamente todos os tipos tumorais, entre eles, câncer hepático, de mama, de cólon, endométrio, do sistema nervoso, de pele, esôfago, bexiga, leucemias etc. Em relação à metilação de DNA, o padrão em células de câncer, quando comparadas às células oriundas de tecidos normais, é bastante característico e bem documentado, sendo descrito de forma resumida como aumento de metilação em regiões promotoras da expressão de genes supressores tumorais, levando ao silenciamento gênico, e perda de metilação em sequências repetitivas (hipometilação global do genoma) (figura 4), o que ocasiona **instabilidade genômica**. Alterações nas histonas também são prevalentes em câncer, como perda ou modificação dos marcadores de repressão e ativação gênica. Assim, modificações do perfil epigenético do DNA em células neoplásicas é de grande relevância na gênese e progressão tumoral.

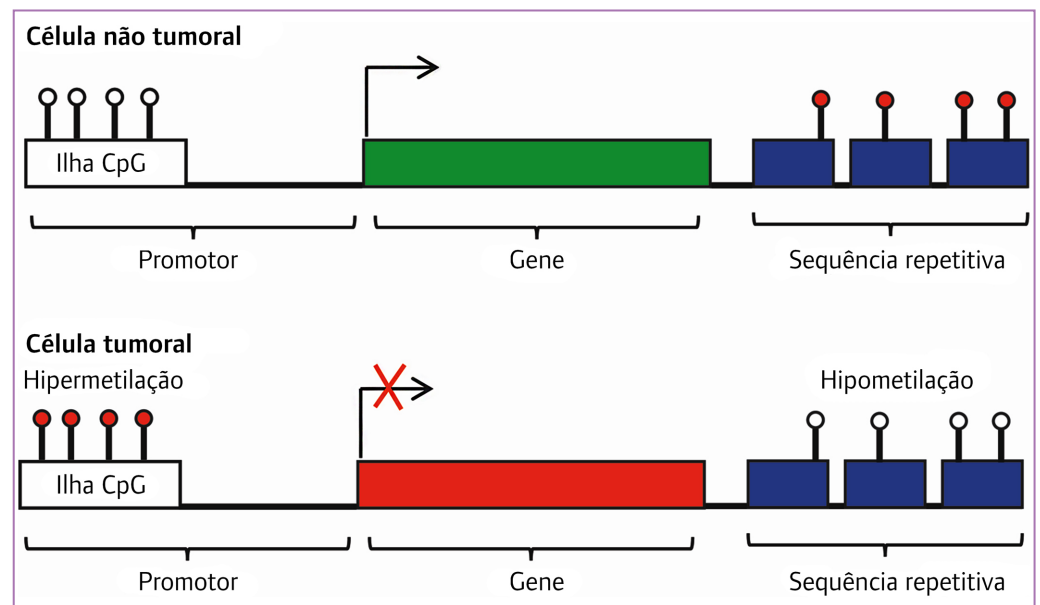


Figura 4.

Epigenética e câncer. O painel superior indica a situação em células normais e, abaixo, as modificações epigenéticas identificadas em células tumorais. Genes supressores de tumor estão ativos (retângulo verde) em células normais; no câncer, estes genes podem ser silenciados pelo ganho de metilação em citosinas localizadas em ilhas CpG na sua região promotora (pirulitos brancos denotam citosinas não metiladas, pirulitos vermelhos, citosinas metiladas) e essa hipermetilação de promotor gênico ocasiona silenciamento da transcrição do gene associado (retângulo vermelho). Em sequências repetitivas de DNA (retângulos em azul), que normalmente estão metiladas em células normais, ocorre perda de metilação em células tumorais (hipometilação global do genoma).

6. HERANÇA EPIGENÉTICA

Como discutido até agora, as marcas epigenéticas contribuem para a memória celular de modo a manter o padrão de expressão gênica em células especializadas, preservando a identidade da linhagem celular após consecutivas divisões mitóticas. Um momento primordial de mudança programada do epigenoma ocorre na formação das células germinativas (gametas). A reprogramação epigenética em gametas ocorre para apagamento de marcas de *imprinting* pré-existentes e estabelecimento das marcas de *imprinting* de acordo com o sexo do indivíduo. Adicionalmente, muito provavelmente a reprogramação é importante para remoção de modificações epigenéticas adquiridas pelo indivíduo, em decorrência da interação com fatores ambientais.

A pergunta fundamental entre os pesquisadores é: será que, ocasionalmente, marcas epigenéticas adquiridas ao longo da vida de um indivíduo podem ser transmitidas através das células germinativas, como resultado de um apagamento incompleto? Existiria a chamada **herança epigenética transgeracional**?

Durante o século XX, uma subpopulação europeia foi submetida a grave restrição calórica por razões históricas. Esse evento representou um modelo para estudar em humanos o impacto transgeracional do ambiente externo: a relação entre dieta, epigenética e expressão gênica (RAVELLI et al., 1976). A chamada fome holandesa ou *Hongerwinter* (inverno da fome) começou em 1944, após a Segunda Guerra Mundial, devido ao fornecimento limitado de alimentos a algumas regiões da Holanda ocupadas pelos nazistas. Como consequência, até maio de 1945, quando o país foi libertado, uma grave restrição de ingestão calórica afetou essas populações, incluindo mulheres grávidas e seus filhos no útero em diferentes estágios da gestação. As crianças nascidas durante ou logo após a fome holandesa apresentaram baixo peso e propensão a intolerância à glicose ao nascer; na fase adulta, esses indivíduos eram mais suscetíveis a diabetes, obesidade, doença coronariana, coagulação sanguínea alterada, doença renal e aumento da resposta ao

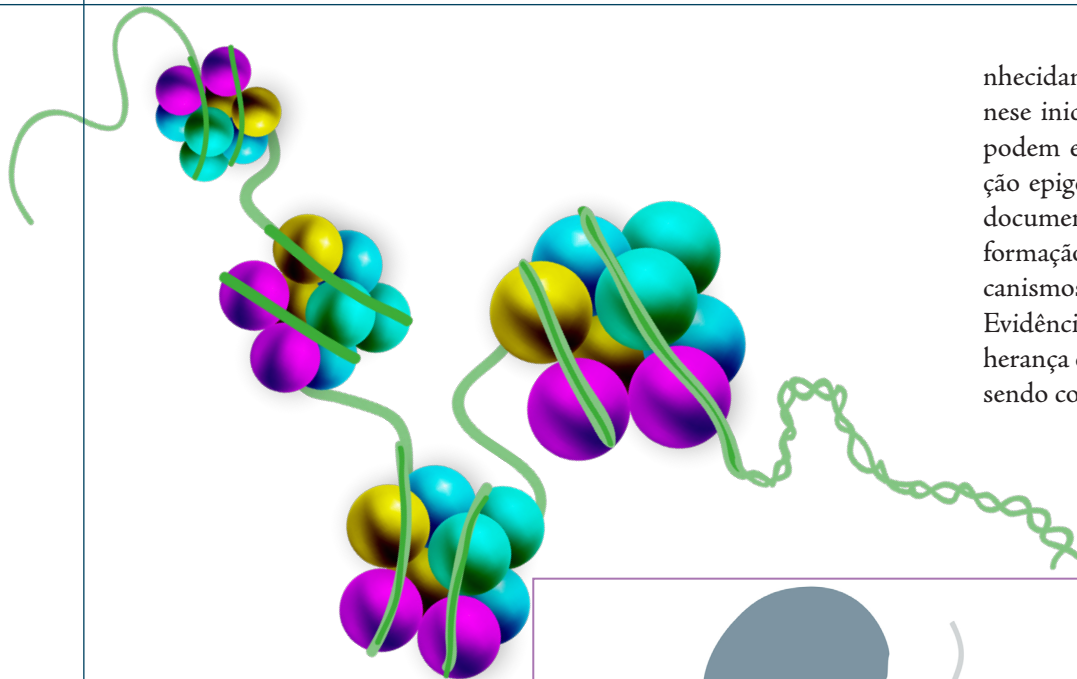
estresse. Sessenta anos depois, descobriu-se que o gene do fator de crescimento 2 (*IGF2*), semelhante à insulina, apresentava perda de metilação nesses indivíduos (filhos), em contraste com seus irmãos do mesmo sexo que não foram expostos a essa privação nutricional durante a gestação. Essa exposição peri-concepcional reforça o importante papel do ambiente na modulação do epigenoma e suas consequências na saúde humana. Ainda mais interessante foi a observação de que filhos desses filhos de mulheres desnutridas durante os três primeiros meses de gestação também sofreram alguns desses efeitos, como suscetibilidade a diabetes e obesidade. Isto poderia ser explicado pela exposição das células germinativas (gametas) dos fetos das mulheres que sofreram desnutrição logo no início da gestação. Dessa forma três gerações são expostas e afetadas pela mesma condição ambiental, seja dieta, toxinas, hormônios, entre outros (figura 5).

A fim de analisar efeitos na prole associados a comportamentos paternos, estudo realizado na Inglaterra com 116 homens fumantes desde os 11 anos observou que seus filhos são mais propensos a ter aumento de massa corporal aos nove anos, em relação a filhos de pais que começaram a fumar com idade mais avançada (PEMBREY et al., 2006). Ainda no mesmo estudo, ao investigar registros de colheitas de uma população isolada no norte da Suécia (*Överkalix*) do século XIX e comparar com os dados dos moradores, foi observado que indivíduos com avós paternos com maior ingestão calórica na adolescência tinham risco aumentado de mortalidade comparado aos indivíduos com avós paternos submetidos a restrição de alimentos.

Embora a manutenção, assim como o apagamento de marcas epigenéticas adquiridas, possa ter efeitos benéficos e deletérios, não se sabe ainda até que ponto tais marcas podem ser mantidas entre gerações nos mamíferos. Por causa dos eventos de reprogramação epigenética durante o desenvolvimento das células germinativas e embriogênese precoce, acredita-se que os estados epigenéticos adquiridos raramente são passados para a progênie. Entretanto, o fato de que as marcas de *imprinting* materno e paterno são reco-

Herança epigenética

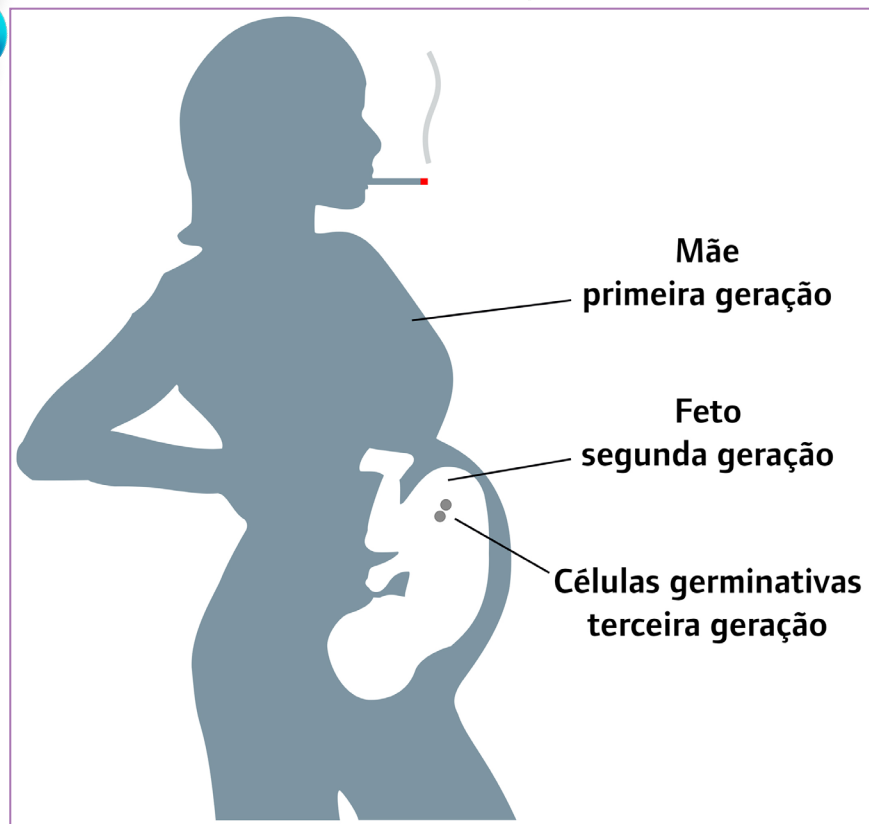
transgeracional: transmissão de algumas marcas epigenéticas adquiridas ao longo da vida através das células germinativas.



nhecidas mantidas durante a embriogênese inicial destaca que algumas sequências podem escapar dos eventos de reprogramação epigenética. Em todas as observações já documentadas de possível transmissão de informação epigenética pelos gametas, os mecanismos são ainda pouco compreendidos. Evidências científicas robustas acerca dessa herança epigenética em humanos ainda estão sendo coletadas.

Figura 5. Herança epigenética transgeracional em humanos.

Evidências crescentes mostram que as marcas epigenéticas conhecidas, como metilação de DNA e modificações de histonas, são fortemente influenciadas por fatores exógenos. O efeito da exposição peri-concepcional a fatores que podem modular o epigenoma vem sendo estudado nas últimas décadas. As condições ambientais a que mulheres grávidas são expostas podem modificar não apenas o epigenoma da gestante (1ª geração), como também o epigenoma do feto (2ª geração), incluindo suas células germinativas (que darão origem à 3ª geração). Desta forma, três gerações seriam expostas à mesma condição ambiental (tabaco, dieta, toxinas, hormônios, medicamentos, nível de atividade física, entre outros), mudando o epigenoma e com potencial impacto na saúde (Figura adaptada de <https://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/inheritance/>).



REFERÊNCIAS

PEMBREY, M. E., BYGREN, L. O., KAATI, G., EDVINSSON, S., NORTHSTONE, K., SJÖSTRÖM, M., GOLDING, J. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *European Journal of Human Genetics* v. 14, p. 159-166, 2006.

RAVELLI, G.-P., STEIN, Z. A., SUSSER, M. W. Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. *New England Journal of Medicine* v. 295, n. 7, p. 349-353, 1976.

WADDINGTON, C. H. (1942). The epigenotype. 1942. *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 10–13, 1942.

WU, C. T., MORRIS, J. R. Genes, genetics, and epigenetics: A correspondence. *Science* v. 293, n. 5532, p.1103-1105, 2001.

PARA SABER MAIS

MESSERSHMIDT, D. M., KNOWLES, B. B., SOLTER, D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes and Development* v. 28, p. 812-828, 2014.